



## **MÀSTER UNIVERSITARI EN OPTOMETRIA I CIÈNCIES DE LA VISIÓ**

### **TREBALL FINAL DE MÀSTER**

---

# **HIDROGELES PARA LIBERACIÓN INTRAOCULAR DE FÁRMACOS**

**MARTA BENITO SABATER**

TZANKO TZANOV  
ESTER GUAUS GUERRERO  
DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA

26 de junio de 2017

Facultat d'Òptica i Optometria de Terrassa

© Universitat Politècnica de Catalunya, any 2017. Tots els drets reservats



## MÀSTER UNIVERSITARI EN OPTOMETRIA I CIÈNCIES DE LA VISIÓ

Els Srs. Tzanko Tzanov i Ester Guaus Guerrero, com a tutor i director del treball,

CERTIFIQUEN

Que el Sra. Marta Benito Sabater ha realitzat sota la seva supervisió el treball "Hidrogeles para liberación intraocular de fármacos" que es recull en aquesta memòria per optar al títol de màster en Optometria i Ciències de la Visió.

I per a què consti, signo/em aquest certificat.

Sr Tzanko Tzanov

Sra Ester Guaus Guerrero

Director/a del TFM

Director/a del TFM

Terrassa, 12 de junio de 2017

Facultat d'Òptica i Optometria de Terrassa

© Universitat Politècnica de Catalunya, any 2017. Tots els drets reservats



## MÀSTER UNIVERSITARI EN OPTOMETRIA I CIÈNCIES DE LA VISIÓ

# HIDROGELES PARA LIBERACIÓN INTRAOCULAR DE FÁRMACOS

### RESUMEN

Debido a la complejidad anatómica y fisiológica del ojo humano, la administración y liberación de fármacos en este órgano es también compleja. En este proyecto se ha obtenido un hidrogel formado a partir de un ácido hialurónico modificado como material de base, con nanopartículas de plata y lignina incorporadas. Por un lado se han sintetizado las nanopartículas y comprobado su actividad antibacteriana frente a *S.aureus* y *P.aeruginosa*, y por otro lado se han producido dos hidrogeles, cada uno de ellos con un ácido hialurónico de diferente peso molecular. La modificación de los ácidos hialurónicos consiste en la adición de grupos tioles a su estructura química. La gelificación del material final se consigue por medio de la acción de la enzima lacasa, de origen natural, de forma que se evita la utilización de compuestos químicos en el proceso. Se observó que el ácido hialurónico de menor peso molecular presenta tras su modificación un mayor número de grupos tioles, aunque ambos tienen la capacidad de formar hidrogeles si se seleccionan adecuadamente las condiciones de concentración, tiempo y temperatura. La metodología seguida para su obtención permite predecir la biocompatibilidad del material final, aunque son necesarios más estudios para poder afirmar la posibilidad de su aplicación como sistema liberador de fármacos oculares.



## MÀSTER UNIVERSITARI EN OPTOMETRIA I CIÈNCIES DE LA VISIÓ

# HIDROGELES PARA LIBERACIÓN INTRAOCULAR DE FÁRMACOS

### RESUM

A causa de la complexitat anatòmica i fisiològica de l'ull humà, l'administració i alliberament de fàrmacs en aquest òrgan és també complexa. En aquest projecte s'ha obtingut un hidrogel format a partir d'un àcid hialurònic modificat com a material de base, amb nanopartícules de plata i lignina incorporades. D'una banda s'han sintetitzat les nanopartícules i comprovat la seva activitat antibacteriana enfront de *S.aureus* i *P.aeruginosa*, i d'altra banda s'han produït dos hidrogels, cadascun d'ells amb un àcid hialurònic de diferent pes molecular. La modificació dels àcids hialurònics consisteix en l'addició de grups tiols a la seva estructura química. La gelificació del material final s'aconsegueix per mitjà de l'acció de l'enzim lacasa, d'origen natural, de manera que s'evita la utilització de compostos químics en el procés. Es va observar que l'àcid hialurònic de menor pes molecular presenta després de la seva modificació un major nombre de grups tiols, encara que tots dos tenen la capacitat de formar hidrogels si se seleccionen adequadament les condicions de concentració, temps i temperatura. La metodologia seguida per a la seva obtenció permet predir la biocompatibilitat del material final, tot i que calen més estudis per poder afirmar la possibilitat de la seva aplicació com a sistema alliberador de fàrmacs oculars.



## MÀSTER UNIVERSITARI EN OPTOMETRIA I CIÈNCIES DE LA VISIÓ

# HIDROGELES PARA LIBERACIÓN INTRAOCULAR DE FÁRMACOS

### ABSTRACT

Due to the anatomical and physiological complexity of the human eye, administration and release of drugs in this organ is also complex. In this project a hydrogel formed from a hyaluronic acid modified as a base material was obtained, with silver and lignin nanoparticles incorporated. On the one hand the nanoparticles have been synthesized and their antibacterial activity against *S.aureus* and *P.aeruginosa* have been tested, and on the other hand two hydrogels have been produced, each of them with a hyaluronic acid of different molecular weight. The modification of hyaluronic acids consists in the addition of thiol groups to their chemical structure. The gelation of the final material is achieved by the action of the enzyme laccase, of natural origin, so as to avoid the use of chemical compounds in the process. It was observed that the lower molecular weight hyaluronic acid exhibits a greater number of thiol groups after modification, although both have the ability to form hydrogels if the conditions of concentration, time and temperature are suitably selected. The methodology followed to obtain it allows predicting the biocompatibility of the final material, although more studies are necessary to be able to affirm the possibility of its application as an ocular drug releasing system.

## AGRADECIMIENTOS

A los directores del trabajo Tzanko Tzanov y Ester Guaus, por guiarme en la realización de este proyecto y ayudarme cuando les he necesitado.

A Sílvia Pérez, Kristina Ivanova e Ivaylo Stefanov, por su paciencia, por su ayuda en todo momento y por todo lo aprendido durante estos meses. Sin vosotros no habría podido desarrollar este trabajo.

A Francesca Perrone y Marc Salat, por su compañía y ayuda estos últimos meses en el laboratorio y por hacerlo todo más llevadero.

A Antía Suárez y Safae Bendali, por su apoyo y su energía, por escucharme y ayudarme a desconectar siempre que lo he necesitado, por cuidarme tanto y por acompañarme durante todo este curso. No habría sido lo mismo sin vosotras.

Y a mi padre, que incluso en la distancia, y pese a mis agobios, ha sabido transmitirme su confianza y apoyo en todo momento.

A todos, GRACIAS.

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>9</b>
<b>2. OBJETIVOS</b>	<b>16</b>
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS:</b>	<b>17</b>
3.1 SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA Y LIGNINA	17
3.2 ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LAS NANOPARTÍCULAS	18
3.3 MODIFICACIÓN DEL ÁCIDO HIALURÓNICO	20
3.3.1 AMINACIÓN	20
3.3.2 EVALUACIÓN DE LOS GRUPOS AMINO	21
3.3.3 TIOLACIÓN	22
3.3.4 EVALUACIÓN DE LOS GRUPOS TIOL	23
3.4 SÍNTESIS DEL HIDROGEL	25
3.5 CARACTERIZACIÓN DEL HIDROGEL	26
<b>4. RESULTADOS</b>	<b>27</b>
4.1 CARACTERIZACIÓN DE LAS NANOPARTÍCULAS DE PLATA Y LIGNINA	27
4.2 ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LAS NANOPARTÍCULAS	30
4.2.1 <i>S.aureus</i> :	30
4.2.2 <i>P.aeruginosa</i> :	31



4.3 CARACTERIZACIÓN DEL ÁCIDO HIALURÓNICO MODIFICADO	33
4.3.1 Caracterización de los grupos amino	33
4.3.2 Caracterización de los grupos tiol	34
4.4 FORMACIÓN DEL HIDROGEL	35
4.5. CARACTERIZACIÓN DEL HIDROGEL	38
<b>5. CONCLUSIONES</b>	<b>39</b>
<b>6. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>41</b>



## 1. INTRODUCCIÓN

El ojo es uno de los órganos más complejos del cuerpo humano, y por ello la administración y liberación de fármacos oculares también es compleja. El transporte de los fármacos oculares aplicados por las vías de administración habituales está restringido por las propias barreras del ojo: hemato-retiniana y hemato-acuosa; lo que hace que la concentración de fármaco necesaria no se mantenga durante mucho tiempo y sea necesario aumentar la frecuencia de administración o la dosis aplicada. Por estas razones se han desarrollado nuevas formas de administración de fármacos.<sup>1-3</sup>

Para las patologías del segmento anterior del ojo, normalmente se administran fármacos tópicos en forma de gotas, pero estas se eliminan rápidamente en unos cinco minutos y solamente un 1-3% del fármaco llega a penetrar en el tejido intraocular, el 75% de las soluciones oftálmicas se pierden por drenaje nasolacrimal y la biodisponibilidad del fármaco ocular es baja.<sup>1-6</sup> Otra forma de administración de fármacos en el segmento anterior son las pomadas oculares, que se mantienen mucho más tiempo en el ojo, pero pueden afectar a la visión o irritar los tejidos. Alternativas a estos tratamientos son las lentes de contacto terapéuticas o los implantes subconjuntivales.<sup>6</sup>

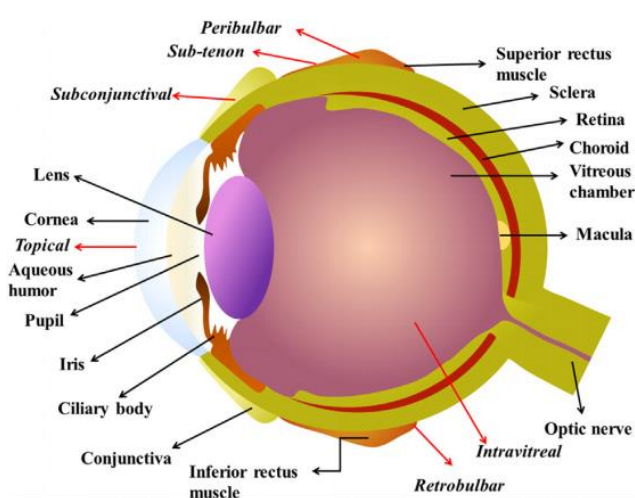


Figura 1.1. Anatomía ocular y vías de administración de fármacos habituales. Las flechas negras señalan las estructuras del ojo, y las rojas las vías de administración. (Figura 1 de la referencia 5).

Para el segmento posterior lo más habitual es administrar los fármacos mediante inyecciones intraoculares o perioculares, pero los fármacos deben atravesar todas las barreras oculares, y esto puede impedir que lleguen al tejido objetivo. Por esto los nuevos sistemas de administración de fármacos desarrollados para el

segmento posterior tienden a ser depósitos implantados o inyectados en el vítreo que liberan el fármaco progresivamente.<sup>1</sup>

Los hidrogeles basados en polímeros naturales son una red tridimensional constituida por elementos entrelazados, que tienen la habilidad de absorber una gran cantidad de agua, son compatibles con sistemas biológicos y con macromoléculas como proteínas y oligonucleótidos, y pueden hacerse degradables o sensibles a varios estímulos, pueden diseñarse para experimentar cambios de volumen en respuesta a pequeños cambios de pH, ionicidad, temperatura, campo eléctrico, solubilidad o campo magnético.<sup>7,8,9,10,11</sup> La aplicación de los hidrogeles como liberadores de fármacos está fundamentalmente relacionada con su capacidad de absorber agua. Se han desarrollado hidrogeles con esta finalidad para diversos órganos del cuerpo humano, entre ellos el ojo.<sup>4,12,13</sup>

Recientemente se han presentado varios estudios donde se explora el uso de hidrogeles como vía de administración de fármacos oculares, tanto en el segmento anterior, de forma tópica, como en el posterior, en forma de inyecciones. En el caso del segmento posterior el desarrollo de un hidrogel como sistema liberador de fármacos a largo plazo y de forma controlada supone una gran ventaja ya que se disminuiría el número de inyecciones.<sup>5</sup>

Por otro lado, las lentes de contacto terapéuticas como dispensadores de fármacos oculares están empezando a ser muy populares, debido a sus ventajas y su biocompatibilidad. Actualmente, numerosos grupos de investigación, han focalizado sus esfuerzos en las diferentes áreas del desarrollo de las lentes de contacto terapéuticas como tratamiento de enfermedades oculares. La liberación de fármacos mediante lentes de contacto permite un tiempo de residencia del fármaco de hasta 30 minutos, en comparación con los apenas 5 que proporcionan las gotas oftálmicas. Esto permite reducir la dosis, la frecuencia de administración, la absorción sistémica del fármaco y los efectos secundarios asociados, y aumenta a su vez la bioestabilidad en un 50%.<sup>3</sup> Algunos estudios demuestran

que las lentes de contacto como sistema dispensador de fármacos son 35 veces más eficientes que las gotas oftálmicas.<sup>2,12,14,15,16</sup>

Por estos motivos, el desarrollo de hidrogeles con fines oftalmológicos, ya sea mediante inyección o como material para lentes de contacto, es un campo en desarrollo y con múltiples posibilidades de cara a futuros sistemas liberadores de fármacos oculares.

Un aspecto a tener en cuenta a la hora de crear nuevos sistemas de aplicación ocular es su actividad antimicrobiana, ya que en las mucosas oculares se hospedan diversas bacterias, algunas de ellas causantes de infecciones como pueden ser las conjuntivitis, blefaroconjuntivitis, dacriocistitis o queratitis, entre otras; estas infecciones pueden llevar a graves complicaciones hasta el punto de la pérdida parcial o total de la visión.<sup>17</sup> En concreto la queratitis microbiana es una patología

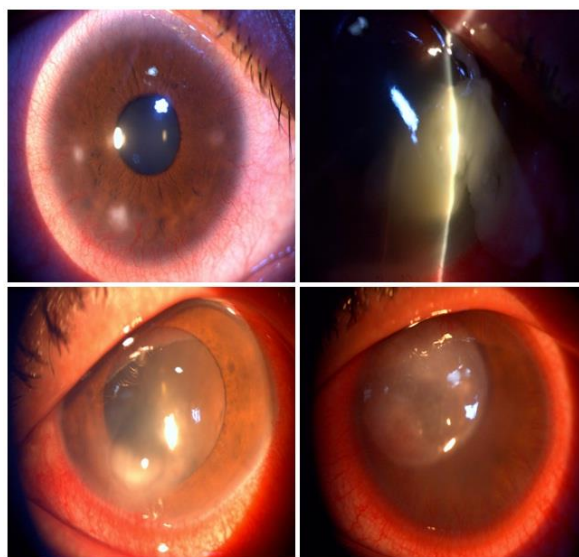


Figura 1.2. Fotografías de pacientes afectados por queratitis microbiana. (Figura 4 de la referencia 20).

potencialmente grave, que cursa con dolor intenso, lagrimeo, enrojecimiento, sensibilidad a la luz y puede terminar en pérdida parcial o total de la visión. Esta alteración puede ser provocada por las bacterias *Staphylococcus aureus* (*S.aureus*, Gram positiva) y *Pseudomonas aeruginosa* (*P.aeruginosa*, Gram negativa), entre otras.<sup>17-19</sup>

En la gravedad de estas infecciones oculares reside la importancia de aplicar agentes bactericidas en los sistemas dispensadores de fármacos oculares, así como en cualquier sustancia que se vaya a aplicar directamente en contacto con un ojo probablemente debilitado o enfermo. Es el caso de las nanopartículas de plata que, además de presentar una buena actividad antimicrobiana, evitan la resistencia de las bacterias frente a antibióticos, con lo que su incorporación en

hidrogeles oftálmicos aporta muy buenas características a los mismos. Estudios demuestran que la actividad antimicrobiana de las nanopartículas de plata es dependiente del tamaño de las mismas, a menor tamaño, mayor efecto antimicrobiano.<sup>21</sup>

Este proyecto está orientado a la síntesis de un hidrogel liberador de fármacos para usos oculares, formado por un ácido hialurónico modificado con nanopartículas de plata y lignina incorporadas en su interior, de forma que aporten su actividad antimicrobiana al hidrogel. La modificación del ácido hialurónico consiste en la adición de grupos tiol, que serán los que reaccionen con la lignina de las nanopartículas por acción de la enzima lacasa.

El ácido hialurónico es un glucosaminoglicano (GAG) no sulfatado compuesto por la repetición de unidades de los disacáridos  $\beta$ -1,4-D-ácido glucurónico y  $\beta$ -1,3-N-acetil-D-glucosamina. Se trata por tanto de un polisacárido natural con numerosas funciones fisiológicas y biológicas debido a sus propiedades químicas y físicas.<sup>22</sup> Existen ácidos hialurónicos de diferentes pesos moleculares, lo que determina algunas de sus propiedades físico-químicas como la viscosidad. En este trabajo se presenta la formación de hidrogeles con ácido hialurónico de dos pesos moleculares completamente distintos. El escoger finalmente uno u otro dependerá de la aplicación final.

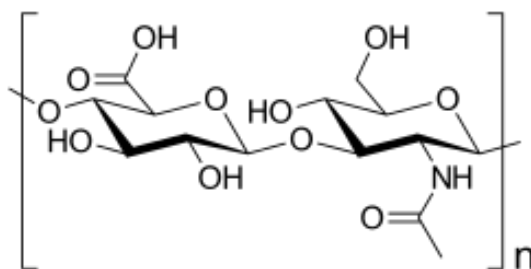


Figura 1.3. Estructura química del ácido hialurónico.

Se han encontrado numerosas e importantes aplicaciones del ácido hialurónico como dispensador de fármacos y en el campo de la cirugía. Concretamente en el caso del ojo, se ha usado para mejorar la absorción y biodisponibilidad de fármacos como la pilocarpina o la gentamicina, aumentando el tiempo de

residencia del fármaco en el ojo.<sup>22-25</sup> También se ha utilizado en cirugías intraoculares para sustituir el humor vítreo y proteger los tejidos<sup>22</sup>, y se han investigado los hidrogeles de ácido hialurónico como portadores de fármacos, proteínas o genes, en forma de capas, membranas, geles inyectables y micro y nanopartículas.<sup>22</sup>

Además, el propio ojo contiene ácido hialurónico. Este es producido por las células de la córnea y forma parte del humor vítreo aportándole las propiedades viscoelásticas que hacen que el vítreo mantenga una presión ocular constante y evite desprendimientos de retina.<sup>26</sup>

Por otro lado, debido a la actividad antibacteriana de las nanopartículas de plata<sup>27</sup>, varios autores han estudiado el uso de estas nanopartículas con fines oftalmológicos, introduciéndolas hidrogeles o en lentes de contacto, y obteniendo muy buenos resultados frente a bacterias gram negativas<sup>28-31</sup>. Como se ha comentado anteriormente, también se han utilizado para evitar la resistencia bacteriana a los antibióticos<sup>32</sup>, y se ha demostrado que la toxicidad que producen en tejidos humanos en dosis terapéuticas es baja.<sup>33,34</sup> Actualmente, además, se están realizando estudios para aplicar nanopartículas de plata como indicadores en imagen de retina, aunque estas investigaciones aún se encuentran en la fase preclínica.<sup>5, 35</sup>

El otro componente de las nanopartículas sintetizadas y utilizadas en este trabajo es la lignina, uno de los biopolímeros más abundantes en las plantas. Su estructura química consta de múltiples unidades estructurales que no suelen repetirse de forma regular debido a que la composición y estructura de la lignina varía dependiendo de su origen y del método de extracción. Entre los grupos funcionales presentes en la lignina, los más reactivos son los grupos fenólicos hidroxilo. Por esto, entre otras características, la lignina es un compuesto fácilmente condensable con fenoles o tioles, lo que es importante para este proyecto ya que, como se ha comentado más arriba, se utilizó un ácido hialurónico con grupos tiol que reaccionan con los grupos fenol de la lignina al formarse el hidrogel. Además la lignina posee propiedades antioxidantes y

antimicrobianas, y aporta estabilidad térmica, biocompatibilidad y biodegradabilidad de los compuestos. La Figura 1.4 muestra una de las estructuras químicas propuestas para la lignina.<sup>36,37</sup>

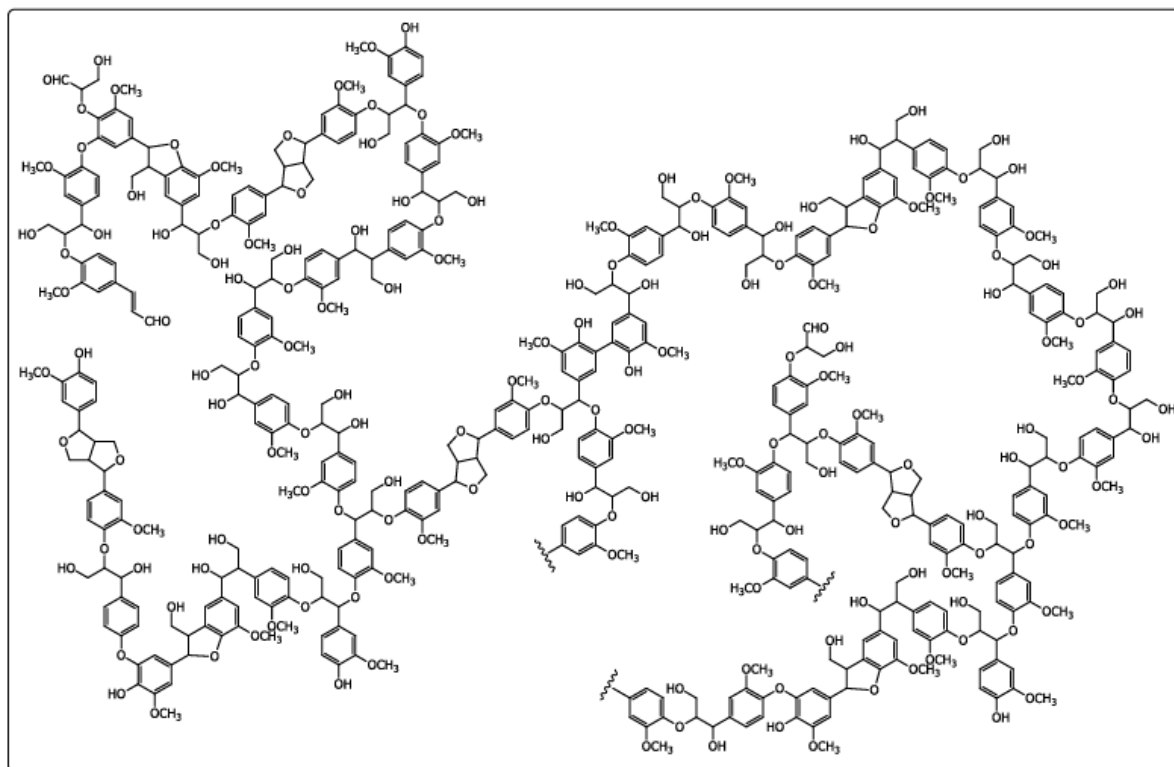


Figura 1.4. Estructura química de la lignina (Figura 1 de la referencia 36).

Finalmente, para la obtención del hidrogel en este proyecto se ha utilizado la enzima lacasa, de forma que no se utilizan reactivos químicos como es habitual en la síntesis de hidrogeles, evitando provocar toxicidad. De esta forma se aumenta la biocompatibilidad del material.<sup>38-40</sup> Previamente, en el grupo de investigación en el que se desarrolló este proyecto, se utilizó la acción de la enzima lacasa para producir hidrogeles basados en quitosano tiolado y el compuesto fenólico, ácido gálico, para su utilización aplicación en el tratamiento de heridas crónicas. Se consiguió preparar un gel covalentemente croslinkado obtenido a través de la reacción catalizada por una enzima en condiciones suaves y evitando la utilización de reactivos químicos peligrosos. Mediante la misma metodología, se pretende en este trabajo, producir hidrogeles con una red de enlaces covalentes formados por la acción de la lacasa entre los grupos –SH del

ácido hialurónico y los grupos –OH de la lignina de las nanopartículas de plata y lignina.<sup>38</sup>

En este trabajo se describirá la formación y caracterización de nanopartículas de plata con lignina, así como la modificación del ácido hialurónico y la caracterización del mismo, que después servirá de base para la formación de un hidrogel con nanopartículas de plata incorporadas. El objetivo final de este proyecto es la obtención de un hidrogel apropiado para aplicaciones intraoculares, sin embargo, es necesario continuar con la investigación para determinar las mejores condiciones en las que se forma el hidrogel y poder caracterizarlo.



## 2. OBJETIVOS

- Objetivo principal:
  - Preparación de un hidrogel antibacteriano de ácido hialurónico con nanopartículas de plata y lignina incorporadas, para usos oftalmológicos.
- Objetivos específicos:
  - Síntesis y caracterización de nanopartículas de plata y lignina.
  - Evaluación de la actividad antibacteriana de las nanopartículas frente a *S.aureus* y *P.aeruginosa*.
  - Síntesis y caracterización del ácido hialurónico modificado.
  - Síntesis y caracterización del hidrogel de ácido hialurónico con nanopartículas de plata y lignina incorporadas.
  - Aprendizaje de diferentes técnicas de laboratorio, y mejora de las competencias sobre investigación y búsqueda científica.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS:

#### 3.1 SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA Y LIGNINA

Para la preparación de las nanopartículas de plata y lignina (Ag-Lig NPs) se utilizaron 60 mL de lignina (Sigma Aldrich) en disolución acuosa al 1%, con un pH de 5.5 ajustado con HCl 0.01M, y 40 mL de  $\text{AgNO}_3$  (>99%, Fluka, Sigma Aldrich) en disolución acuosa de 2 mg/mL (todas las disoluciones del trabajo se prepararon en agua MilliQ). Ambas disoluciones se atemperaron en un baño de agua a 60°C durante 10 minutos antes de mezclarlas (incubadora OLS 200, Grant); y una vez juntas se dejaron reaccionar agitándose durante 72 horas y a la temperatura de 60°C.

Con el objetivo de seguir la evolución de la formación de las Ag-Lig NPs, a las 24 y 72 horas se diluyeron 20µL de la mezcla de reacción con 180µL de agua y se midió el tamaño de las nanopartículas mediante el análisis Dynamic Light Scattering (DLS, Vasco 2, Vasco), recogido en la Tabla 4.1, y la absorbancia de las mismas entre 230 y 600 nm con el espectrofotómetro (Lector Infinite M200, Tecan). Las nanopartículas de plata muestran un pico de absorbancia característico, debido a sus propiedades ópticas, en torno a 400-420 nm, como se puede observar en las Figuras 4.1 y 4.2.

Pasadas las 72 horas de evolución de la reacción, se procedió a la limpieza de las nanopartículas, para lo cual se centrifuga 1 mL de la mezcla a 13844 rpm durante 40 minutos (Centrifuge 5424, Eppendorf) consiguiendo así separar las Ag-Lig NPs, que quedan depositadas en el fondo, del resto de materiales que no han reaccionado y que se retiraron. Posteriormente, se resuspendieron las nanopartículas en 1 mL de agua y se procedió a su caracterización. Para dicha caracterización se utilizaron los análisis de DLS y del potencial Z (Zetasizer Nano Z, Malvern Instruments), los resultados se han recogido en las Tablas 4.1 y 4.2.

En total, se realizaron seis lotes de Ag-Lig NPs. Se seleccionaron para su incorporación en el hidrogel aquellos que presentan un tamaño, estabilidad y actividad antimicrobiana óptimos.

### 3.2 ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LAS NANOPARTÍCULAS

Se analizó la actividad antimicrobiana de las nanopartículas frente a las bacterias *S.aureus* (ATCC® 10145™) y *P.aeruginosa* (ATCC® 25923™). Para esto se prepararon los medios de crecimiento de las bacterias: Nutrient Broth (Scharlab) (1.3 g en 100 mL de agua), Baird Parker Agar (Sigma Aldrich) (58 g en 950 mL de agua) y Cetrimide Agar (Sigma Aldrich) (49.7 g en 990 mL de agua y 10 mL de glicerol), y se esterilizaron. Por último se añadieron 50 mL de yema de huevo (Sigma Aldrich) al Baird Parker Agar. Una vez hecho esto se pusieron los medios Baird Parker Agar (para la bacteria *S.aureus*) y Cetrimide (para *P.aeruginosa*) en placas de Petri y se guardaron en frío.<sup>41-43</sup>

Se introdujo cada bacteria en 5 mL del medio Nutrient Broth preparado anteriormente y se incubaron agitándose (Incubadora BS-T, Certomat) a 37°C durante 6-8 horas, junto con un tubo que sólo contenía el medio y que sirve como control para comprobar que no se ha producido contaminación durante el proceso de crecimiento de las bacterias.

Una vez las bacterias estuvieron listas y se comprobó que no hay contaminación (se observa turbidez en el tubo que contiene bacterias mientras que el tubo control es transparente), se midió la absorbancia a 600 nm del medio Nutrient Broth y de las bacterias, y se calculó la diferencia de absorbancia entre cada bacteria y el medio, para diluirlas en el medio de forma que la densidad óptica sea  $OD_{600}=0.01$ , que se corresponde aproximadamente con  $10^5$  unidades formadoras de colonias por mililitro (CFU/mL).<sup>41-43</sup>

En otras dos placas de 96 pozos (una para cada bacteria) se prepararon 50 µL de diferentes concentraciones de las nanopartículas (limpiadas previamente de la misma forma que en el apartado anterior) en Nutrient Broth, y se añadieron 50 µL de las bacterias diluidas. También se pusieron 50 µL de Nutrient Broth con 50 µL de bacterias, que sirve como control para comprobar que las bacterias sí crecen en el medio, 50 µL del antibiótico gentamicina (Sigma Aldrich) con 50 µL de bacterias, para comprobar su actividad antimicrobiana, y 100 µL de Nutrient Broth sin bacterias para comprobar que no ha habido contaminación durante el proceso.

Se midió la absorbancia de estas placas el mismo día que se hicieron y tras haber estado 24 horas agitándose en la incubadora a 37°C, de esta forma se vio la diferencia de absorbancia en cada concentración de nanopartículas, lo que se relaciona directamente con el crecimiento de las bacterias en estas concentraciones. El cálculo de la reducción del crecimiento bacteriano que provocan las Ag-Lig NPs se realiza mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Reducción Bacteriana (\%)} = [(A-B)/A] \times 100$$

donde A y B indican la densidad óptica a 600 nm ( $DO_{600}$ ) de las muestras a las 24 horas sin nanopartículas (control) y con ellas, respectivamente.<sup>41,42</sup>

De esta forma se obtuvo la concentración mínima de Ag-Lig NPs que inhibe el crecimiento de las bacterias (MIC, Minimun Inhibitorial Concentration). Esto se puede ver a simple en las placas tras las 24 horas de incubación ya que las concentraciones más bajas presentan un medio turbio ya que las bacterias han crecido, mientras que los pozos que contengan la concentración suficiente de nanopartículas como para evitar el crecimiento de las bacterias son de aspecto claro.

Para comprobar cuáles son las concentraciones de nanopartículas que matan las bacterias (MBC, Minimun Bactericidal Concentration), se plaquearon 15 µL de los pozos correspondientes al MIC, el anterior y el posterior (es decir, las dos concentraciones más bajas en las que no se ven bacterias, y la más alta en la que sí se ven), en las placas de los correspondientes medios. Tras esto se incubaron durante 24 horas a 37°C (Incubadora MIR-262, Sanyo) para que crezcan y poder evaluarlas al día siguiente.

Al sacarlas de la incubadora tras 24 horas, se espera encontrar bacterias en la concentración menor, y no en la mayor, mientras que en la que correspondía al MIC, puede que no haya bacterias o que las haya en menor cantidad, ya que en los pozos no se ven bacterias porque esta concentración inhibe el crecimiento pero no las mata totalmente.

### 3.3 MODIFICACIÓ DEL ÀCIDO HIALURÓNIC

La modificació del àcid hialurònic (HA) consta de dos passos, el primer és una aminació mitjançant la addició de àcid adípico dihidràcid (ADH;  $\geq 98\%$ , Sigma-Aldrich), (Figura 3.1); i el segon és la tiolació del material amb el reactiu Traut (Figura 3.5). Tot el procés es realitzà amb dos àcids hialurònics de diferent pes molecular: 200 kDa (Lifecore Biomedical) i 1.8 MDa (Fluka).

#### 3.3.1 AMINACIÓ

Se dissolgueren 500 mg del àcid hialurònic de baix pes molecular i 55.5 mg del de alt pes, en 100 mL d'aigua, a la que se li afegiren 9.17 g d'ADH i se agità durant 30 minuts. El pH d'aquesta mescla es ajustà a 4.8 mitjançant l'addició de HCl 1.0M. Una vegada ajustat se afegiren 0.83 g de N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida clorhidrat (EDAC;  $>99\%$ , Sigma Aldrich) i se deixà reaccionant durant dos hores. Al afegir el reactiu EDAC se observa un augment del pH, per lo que cal mantenir-lo en 4.8 mitjançant l'addició de HCl 1.0M cada 10-15 minuts. Passades les dos hores la reacció es detingué augmentant el pH a 7.0 mitjançant l'addició de NaOH 1M. La solució es dialitzà durant un dia per retirar els components que no han reaccionat. Una vegada terminada la diàlisi se afegiren 58.5 g/L de NaCl (99%, Sigma Aldrich) i la mateixa quantitat d'acetona que la que hi ha d'aigua (de forma que queda una dissolució amb un 50% d'acetona), i se deixà en repòs fins que el HA-ADH precipità. Per últim se centrifugà durant 30 minuts a 4000 rpm i  $4^{\circ}\text{C}$  (Allegra X-15R, Beckman Coulter), se retirà el sobrant i se repetí tot el procés de purificació.<sup>24, 43</sup>

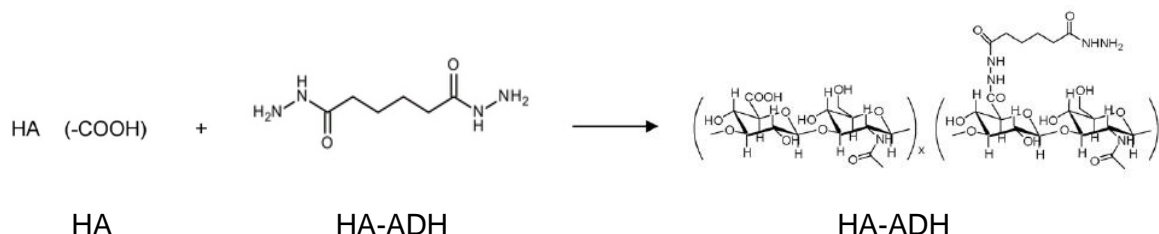


Figura 3.1. Representació de la síntesi de HA-ADH. (Figura 1A de la referència 43).

Por último, antes de pasar a la caracterización del material obtenido, se congeló y se liofilizó para eliminar el agua (Liofilizador Cryodos, Telstar), obteniendo un material esponjoso, más estable para almacenarlo que una disolución y más fácil de manejar.

### 3.3.2 EVALUACIÓN DE LOS GRUPOS AMINO

Para evaluar la modificación del HA con ADH se realizaron análisis mediante el reactivo fluorescamina (>98%, Sigma Aldrich) y espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier (FTIR Spectrum 100R, Perkin Elmer).

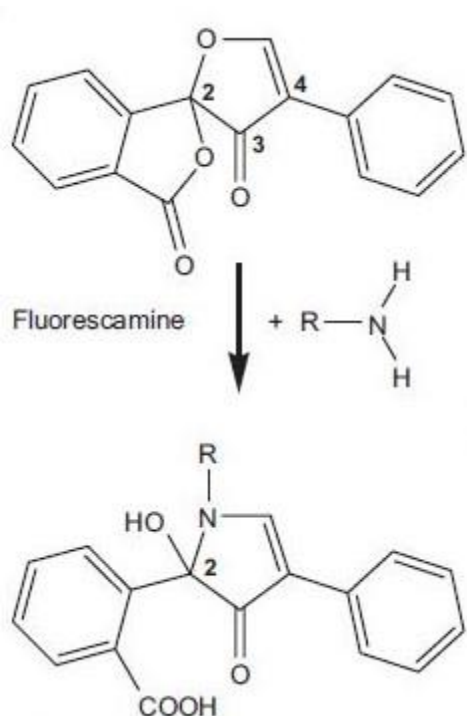


Figura 3.2. Estructura química de la fluorescamina y su reacción con aminas primarias. (Figura 1 de la referencia 44).

La fluorescamina es un compuesto utilizado para la cuantificación de aminas primarias. Su reacción con los grupos amino produce una fluorescencia que nos permite calcular la cantidad de aminas presentes en el compuesto.<sup>44</sup>

Para el análisis con fluorescamina, en primer lugar se hizo una recta de calibrado con ADH en concentraciones de 15.62  $\mu$ M a 250  $\mu$ M. Se preparó una disolución de 3 mg/mL de fluorescamina en dimetilsulfóxido (DMSO, >99.9%, Sigma Aldrich), y se añadieron 50  $\mu$ L de esta disolución a 150  $\mu$ L de cada concentración de ADH. Estas muestras se incubaron durante tres minutos a temperatura

ambiente y se midió su fluorescencia en las longitudes de onda de 390 a 470 nm (Ex/Em 390-470 nm).<sup>44</sup>

La recta de calibrado obtenida se muestra en la siguiente gráfica:

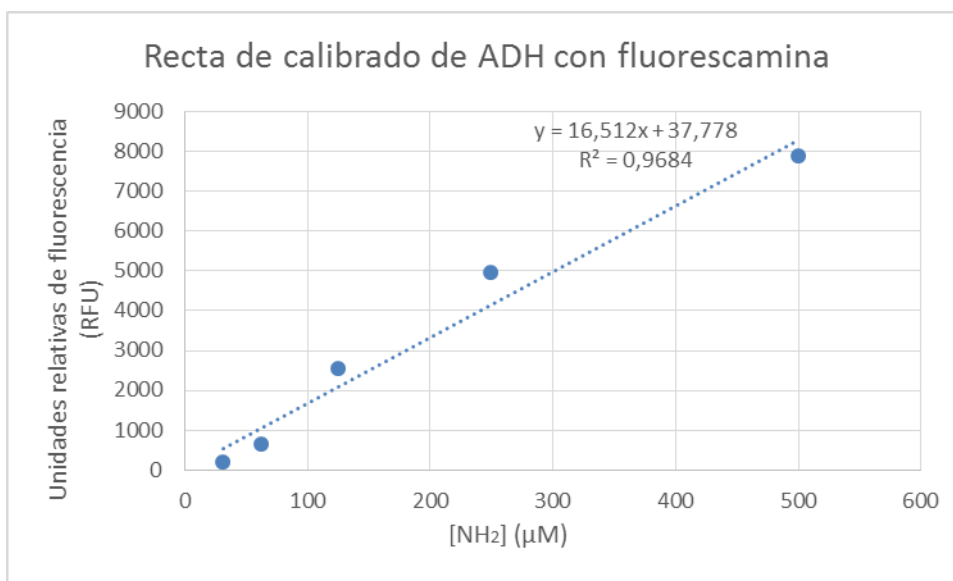


Figura 3.3. Recta de calibratge de ADH realitzada amb el reactiu fluorescamina.

Para analizar la incorporación de grupos NH<sub>2</sub>, procedentes del compuesto ADH, en los ácidos hialurónicos preparados se separó una parte del material liofilizado para hacer la disolución y se realizó el mismo procedimiento que para la recta de calibrado, pero sustituyendo las disoluciones de ADH por las de los ácidos hialurónicos modificados con ADH. Una vez obtenidos los datos de fluorescencia de las muestras (directamente proporcionales con la cantidad de grupos amino), se extrapolan con la fórmula de la recta de calibración y se calcula los μmoles de NH<sub>2</sub> por mg de HA-ADH.<sup>45</sup> Los resultados se muestran en el siguiente capítulo.

### 3.3.3 TIOLACIÓ

Una vez se hubo comprobado que la adición de grupos amino al HA era correcta, se volvió a modificar el ácido hialurónico añadiendo ahora grupos tiol (-SH). Con esta segunda modificación obtenemos el material final que se utilizará para formar el hidrogel junto con las Ag-Lig NPs. Como se ha comentado anteriormente, la finalidad de modificar el ácido hialurónico es obtener grupos tiol que reaccionen con los grupos fenol de la lignina, formando finalmente el hidrogel.

Una vez disuelto el material liofilizado, se añadieron 2.5 mL de una disolución de PB (phosphate buffer, 0.1M, pH 8, preparado a partir de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O (sodium



phosphate monobasic dihydrate,  $\geq 99\%$ , Sigma-Aldrich) y  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  anhydrous (Sodium phosphate dibasic anhydrous, Sigma-Aldrich) con 192.5 mg del reactivo Traut (2-Iminothiolane hydrochloride,  $\geq 98\%$ , Sigma Aldrich) y se dejó reaccionar durante dos horas. Para evitar la oxidación de los grupos tiol es importante desoxigenar bien las muestras con nitrógeno tanto antes como después de añadir el reactivo Traut y mantenerlas protegidas de la luz. Después de la reacción se precipitó y centrifugó el HA-SH dos veces de la misma forma que en el primer paso (50% de acetona y 58.5 g/L NaCl, centrifugación a 4000 rpm y  $4^\circ\text{C}$  durante 30 minutos). Una vez purificado y retirado el sobrante se congeló para después liofilizarlo (Liofilizador Cryodos, Telstar), obteniendo un material esponjoso, más estable para almacenarlo que una disolución y más fácil de manejar.<sup>43</sup>



Figura 3.4. HA-SH obtenidos tras la liofilización. A: HA de bajo peso molecular, B: HA de alto peso molecular.

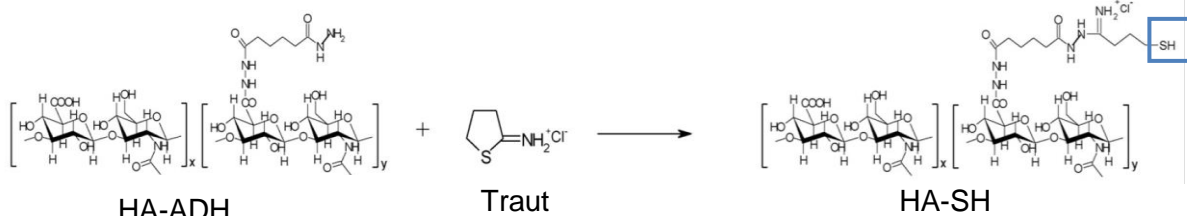


Figura 3.5. Representación de la síntesis del HA-SH. (Figura 3 de la referencia 43)

### 3.3.4 EVALUACIÓN DE LOS GRUPOS TIOL

Para evaluar la tiolación del material se realizó también el análisis de espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier de los dos HA-SH liofilizados y se cuantificaron los grupos tiol mediante el reactivo Ellman.<sup>38</sup>

El reactivo Ellman (5,5'-ditiobis(2-ácido nitrobenzoico)) es utilizado para la cuantificación de los grupos tiol, ya que reacciona ante ellos aumentando la absorción.<sup>46,47</sup>

El primer paso para realizar el análisis con el reactivo Ellman, igual que se hizo para la cuantificación de los grupos amino, es la realización de una recta de calibrado, en este caso con el aminoácido L-Cisteína. Se añadieron 3 mg del reactivo Ellman a 10 mL de un buffer fosfato (PB) 0.1M con pH 8, y se prepararon siete tubos de diferente concentración como indica la siguiente tabla:

Tabla 3.2. Proporciones para la recta de calibrado para la evaluación de los grupos tiol.

Tubo	PB (mL)	Cisteína (mg)	Concentración (mM)
<b>A</b>	50	13.17	1.5
<b>B</b>	2.5	12.5	1.25
<b>C</b>	5	10	1
<b>D</b>	7.5	7.5	0.75
<b>E</b>	10	5	0.5
<b>F</b>	12.5	2.5	0.25
<b>G</b>	15	0	0 (Control)

De cada uno de estos tubos se sacaron 250  $\mu$ L a los que se añadieron 50  $\mu$ L del reactivo Ellman y 2.5 mL del PB, se mezcló bien el contenido de cada tubo y se dejaron reaccionar durante 3 horas a oscuras y a temperatura ambiente. Al añadir el reactivo Ellman se ve que las muestras adquieren un color amarillo, este cambio es mayor cuanto más cantidad de L-Cisteína contienen. Pasado este tiempo se midió la absorbancia de los tubos a 412 nm, obteniendo los datos para construir la recta de calibrado.<sup>38</sup>

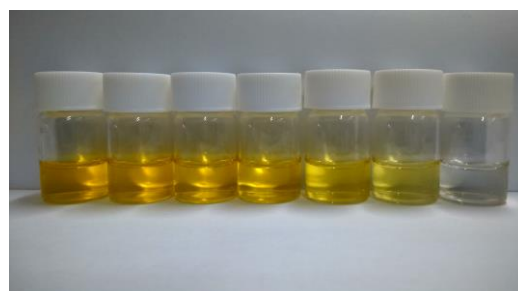


Figura 3.6. Muestras para la recta de calibrado de L-Cisteína, se puede observar la diferencia en el cambio de color según la concentración de L-Cisteína.

Para evaluar la tiolación del material, se realizó el mismo procedimiento pero midiendo un tubo con 50  $\mu$ L del reactivo Ellman, 2.5 mL del PB y 250  $\mu$ L de la muestra en vez de cisteína. La absorbancia de las muestras es directamente proporcional con la cantidad de grupos tiol que contienen, la concentración de

grupos tiol se calcula extrapolando la absorbancia obtenida con la fórmula de la recta de calibrado.

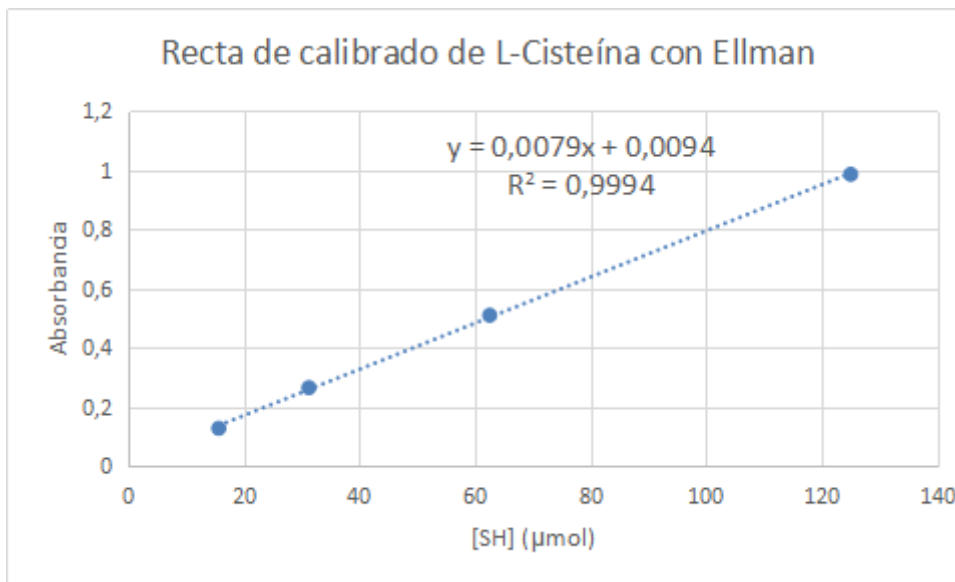


Figura 3.7. Recta de calibrado con L-Cisteína para la evaluación de los grupos tiol.

### 3.4 SÍNTESIS DEL HIDROGEL

Para sintetizar el hidrogel debemos incorporar las nanopartículas al ácido hialurónico y provocar el crosslinking, que se lleva a cabo como se ha explicado anteriormente por la acción de la enzima lacasa.<sup>39</sup>

Se utilizaron diferentes concentraciones de los dos HA-SH (diluido en un buffer de pH 5.5), para la optimización de las condiciones experimentales de la gelificación. Se añadieron 0.1 mL de diferentes concentraciones de las nanopartículas (limpiadas como se ha explicado anteriormente pero esta vez con un buffer de pH 5.5 en vez de agua), a 0.4 mL de las distintas concentraciones de HA-SH, y se incuban hasta 50°C (Infors AG).<sup>38</sup>

Una vez ha llegado a los 50°C, se añaden 50 μL de la enzima lacasa (Biocatalysts, UK). Para preparar este reactivo se hace una disolución del mismo de 20 mg/ml en un buffer de pH 5.5, se agita durante 10 minutos y se centrifuga durante 5 minutos a 5000 rpm, para que precipite y poder separar el sobrante que es lo que utilizaremos para añadir al hidrogel.<sup>38</sup>

También se realizó una muestra control que sólo contenía el ácido hialurónico y las nanopartículas, sin lacasa, para poder compararlos y comprobar la efectividad de la enzima en la gelificación.

Una vez mezclado todo, se incuban las muestras a 50°C, ya que esta es la temperatura más adecuada para la acción de la lacasa<sup>40</sup>, durante varias horas para observar el tiempo que tardan en gelificar y determinar las condiciones óptimas de concentración, tiempo y temperatura.

### 3.5 CARACTERIZACIÓN DEL HIDROGEL

Se estudió el comportamiento reológico del hidrogel, para lo que dispusimos del reómetro ARG2 (TA Instruments, U.K.). El análisis reológico nos aporta información sobre la viscosidad y el punto de gelificación de los materiales.

Para hacer este análisis, el reómetro aplica una fuerza rotacional oscilatoria sobre la muestra y mide el esfuerzo necesario para producir una determinada velocidad angular, de este modo calcula la viscosidad del material.

## 4. RESULTADOS

### 4.1 CARACTERIZACIÓN DE LAS NANOPARTÍCULAS DE PLATA Y LIGNINA

En las Figuras 4.1 y 4.2 se muestra la absorbancia de las Ag-Lig NPs a las 24 y 72 horas de su formación, respectivamente. Se puede ver que a las 24 horas el pico característico de estas nanopartículas en torno a los 400-420 nm no existe o es pequeño, mientras que a las 72 horas ha aumentado, indicándonos que las nanopartículas se están formando correctamente.

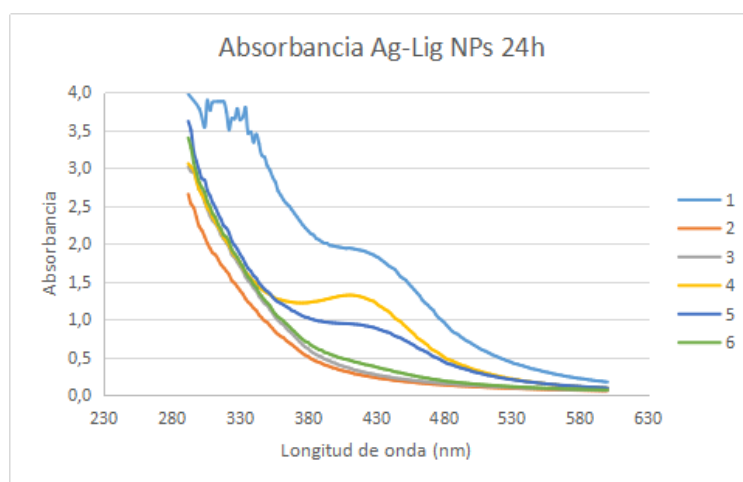


Figura 4.1. Absorbancia de las nanopartículas a las 24 h. Las series 1-6 corresponden a los 6 lotes de Ag-Lig NPs realizadas.

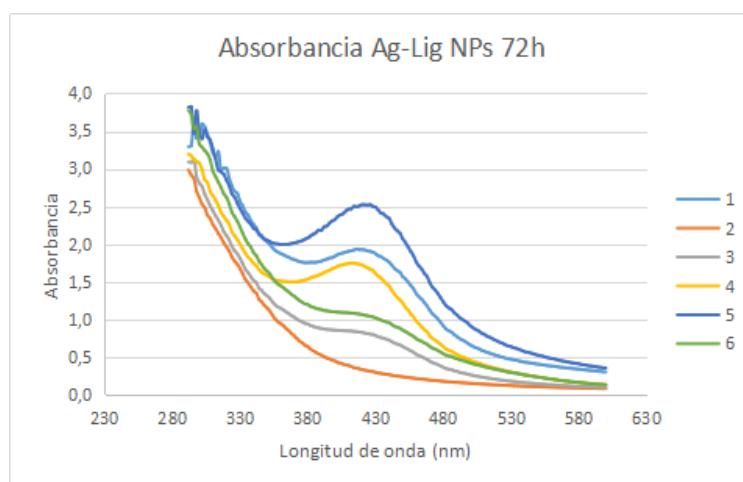


Figura 4.2. Absorbancia de las nanopartículas a las 72 h. Las series 1-6 corresponden a los 6 lotes de Ag-Lig NPs realizadas.

Los datos de absorbancia a 420 nm y de tamaño de las nanopartículas durante su formación están recogidos en la Tabla 4.1. Se puede observar cómo el valor máximo de absorbancia de las nanopartículas en torno a los 420 nm aumenta en todos los casos, en mayor o menor medida, al pasar de 24 a 72 horas, esto también nos confirma que la formación de las nanopartículas se está llevando a cabo durante los tres días que dura la reacción. En el caso de las nanopartículas que se prepararon en segundo lugar, no aparece pico de absorbancia, lo que indica algún fallo en la síntesis de este lote de nanopartículas; mientras que las que se sintetizaron en tercer lugar no presentaron pico de absorbancia a las 24 horas pero sí a las 72.

Tabla 4.1. Absorbancia y tamaño de las nanopartículas de plata y lignina a las 24 y 72 horas de su formación.

Ag-Lig NPs	Pico de absorbancia ( $\approx 420$ nm)		Tamaño (DLS)	
	24 h	72 h	24h	72 h
1	1.9278	1.9336	63.61 nm PDI: 0.20638	44.73 nm PDI: 0.34912
2	-	-	-	84.1 nm PDI: 0.22827
3	-	0.8207	59.63 nm PDI: 0.23088	50.1 nm PDI: 0.15039
4	1.3238	1.7437	39.7 nm PDI: 0.02966	44.77 nm PDI: 0.12032
5	0.9265	2.5216	158.28 nm PDI: 0.29629	38.26 nm PDI: 0.35047
6	0.3738	1.0145	80.93 nm PDI: 0.18888	63.26 nm PDI: 0.15798

En cuanto al tamaño de las nanopartículas, medido con el análisis DLS, se observa que, excepto en el caso de las nanopartículas del cuarto lote, el tamaño de las mismas disminuye en mayor o menor grado a medida que se completa su formación. En el caso de las segundas nanopartículas no se pudo medir su tamaño a las 24 horas. El factor PDI es el índice de polidispersidad, que nos indica la distribución de tamaños de las partículas con un valor entre 0 y 1, en porcentaje nos indicaría el ancho de la distribución gaussiana asumida. Un valor de PDI menor de 0.05 es muy difícil de obtener experimentalmente, sólo se

encuentra en estándares que son monodispersos. Un valor mayor de 0.7 indica una distribución de tamaños muy amplia, lo que hace que la muestra no sea adecuada para el análisis con DLS. El rango en el que los algoritmos de distribución funcionan mejor es entre 0.08 y 0.7. En el caso de las nanopartículas podemos ver que el valor PDI no es mayor de 0.7 en ningún caso por lo que las muestras son válidas para este análisis. En todos los casos obtenemos un valor bastante bajo, indicando que todas las producciones presentan una dispersidad del tamaño de las partículas es baja.<sup>48</sup>

Una vez terminada la reacción y con las nanopartículas limpias, se caracterizaron mediante la medida del potencial Z y, de nuevo, el tamaño mediante DLS.

En la Tabla 4.2 se recogen los datos de estos dos análisis. Con el análisis del potencial Z se miden las cargas en las interfases de los sistemas, lo que nos indica la estabilidad de los mismos. Un valor más positivo de +30mV o más negativo de -30mV se considera estable.<sup>49</sup> En nuestro caso el potencial Z siempre sale negativo y en torno a -45 mV, por lo que las nanopartículas son estables y cargadas negativamente.

Tabla 4.2. Resultados de los análisis Z potencial y DLS de las Ag-Lig NPs.

Ag-Lig NPs	Potencial Z (mV)	Tamaño (DLS)
1	-45 ± 11.8	67.2 nm PDI: 0.16953
2	-50 ± 7.93	65.51 nm PDI: 0.19602
3	-49 ± 13	44.61 nm PDI: 0.20264
4	-43.6 ± 8.65	34.66 nm PDI: 0.16914
5	-42.1 ± 16.5	43.79 nm PDI: 0.18655
6	-40.5 ± 5.24	71.62 nm PDI: 0.15849

En los resultados del tamaño de las nanopartículas se puede observar que todas las muestras contienen nanopartículas de entre 34 y 72 nm, con un índice de polidispersidad bajo, y que casi todas ellas han disminuido su tamaño al finalizar la reacción.

A partir de los respectivos resultados de absorbancia, tamaño y potencial Z se seleccionó el sexto lote de Ag-Lig NPs, por lo que de aquí en adelante se



presentan sólo resultados de estas nanopartículas, y son las que más tarde se utilizaron para incorporarlas al ácido hialurónico modificado para formar el hidrogel.

## 4.2 ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LAS NANOPARTÍCULAS

Como se ha explicado en el capítulo anterior, se analizó la actividad antibacteriana de las Ag-Lig NPs frente a las bacterias *S.aureus* y *P.aeruginosa*.

### 4.2.1 *S.aureus*:

En la Figura 4.3 se ha representado la inhibición del crecimiento bacteriano que presentan las nanopartículas para *S.aureus*, así como la del control y el antibiótico (AB).

El control contiene el medio y las bacterias, de forma que asegura que las bacterias crecen en este medio, por tanto la efectividad de esta muestra frente a *S.aureus* debe ser del 0%, como se puede observar en la gráfica. El antibiótico usado es gentamicina y su efectividad contra la bacteria es casi del 100%.

En cuanto a los valores de las muestras que contienen nanopartículas, se puede observar en la gráfica que todas las concentraciones utilizadas son bastante efectivas frente a *S.aureus*, excepto la muestra que se diluyó 128 veces; por tanto, la mínima concentración de nanopartículas que inhibe el crecimiento de las bacterias (MIC) es la que se diluyó 64 veces.

Se plaquearon las muestras correspondientes a las diluciones de 32, 64 y 128 veces, para saber cuál es la mínima concentración que extingue las bacterias (MBC). En la Figura 4.4 se muestran las placas con las bacterias *S.aureus* que han crecido tras haberlas incubado durante 24 horas. Como era de esperar se observan bacterias en las muestras que contienen las nanopartículas más diluidas y algunas pocas en las correspondientes a la dilución anterior. Sin embargo, en las muestras más concentradas no se observa ninguna bacteria, esto quiere decir que, antes de incubarlas no había bacterias en estas muestras puesto que las nanopartículas a esta concentración son bactericidas frente a *S.aureus*.

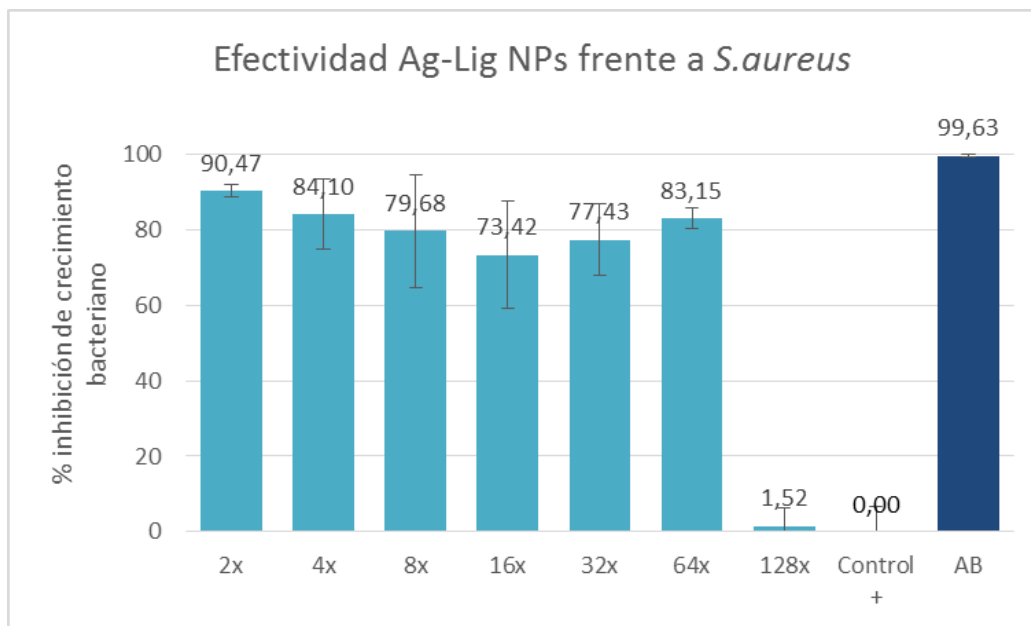


Figura 4.3. Efectividad de las nanopartículas de plata y lignina frente a *S.aureus*

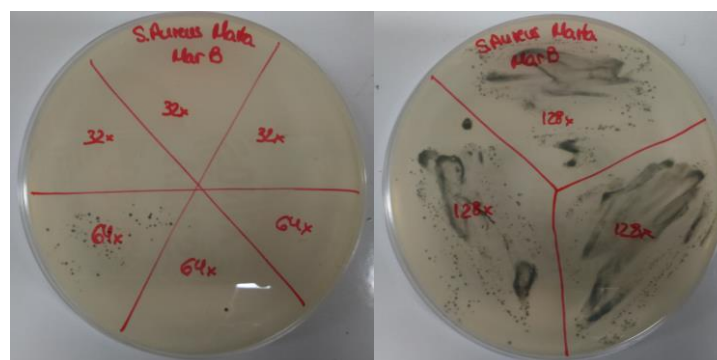


Figura 4.4. Bacterias *S.aureus* obtenidas en las diferentes concentraciones de nanopartículas.

#### 4.2.2 *P.aeruginosa*:

En el caso del análisis de la actividad antimicrobiana frente a *P.aeruginosa*, se siguió el mismo procedimiento que en el caso anterior.

La Figura 4.5 muestra el porcentaje de inhibición de crecimiento bacteriano de *P.aeruginosa* que presentan las distintas concentraciones de nanopartículas.

Al igual que ocurría con la bacteria *S.aureus*, en este caso obtenemos los valores esperados para el control y el antibiótico. Sin embargo, no encontramos ninguna concentración de nanopartículas en la que se diera crecimiento bacteriano (todos

los valores de la gráfica son bastante altos), por lo que las nanopartículas son más efectivas en cuanto a inhibir el crecimiento de las bacterias *P.aeruginosa*.

A pesar de esto sí que se encontró la concentración mínima que extingue las bacterias (MBC) al plaquear distintas concentraciones e incubarlas; como se observa en la Figura 4.6, las muestras que contenían nanopartículas diluidas 16 veces son bactericidas frente a *P.aeruginosa*.

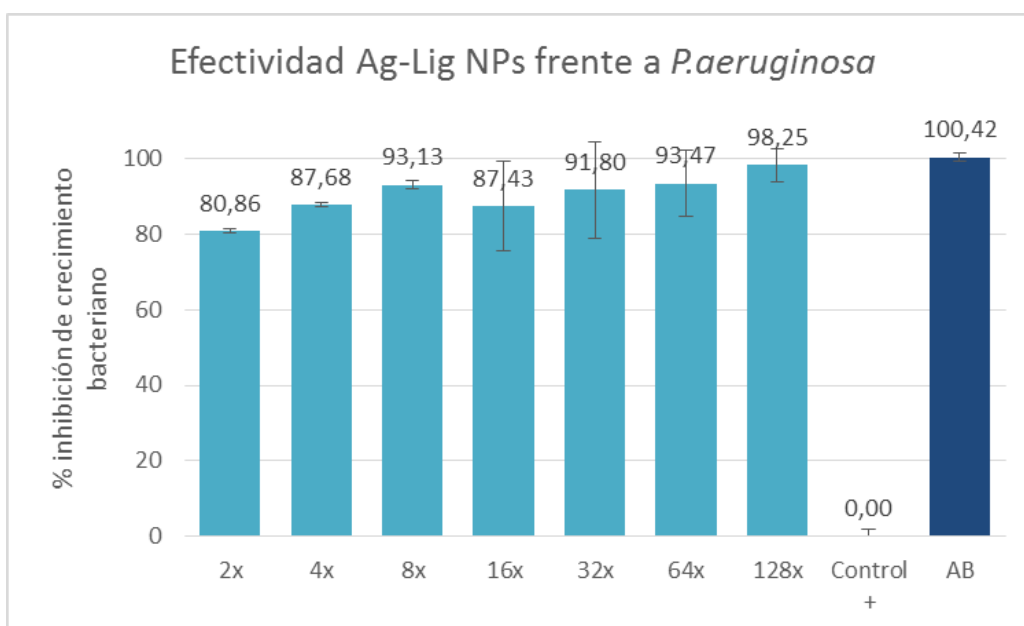


Figura 4.5. Efectividad de las nanopartículas de plata y lignina frente a *P.aeruginosa*

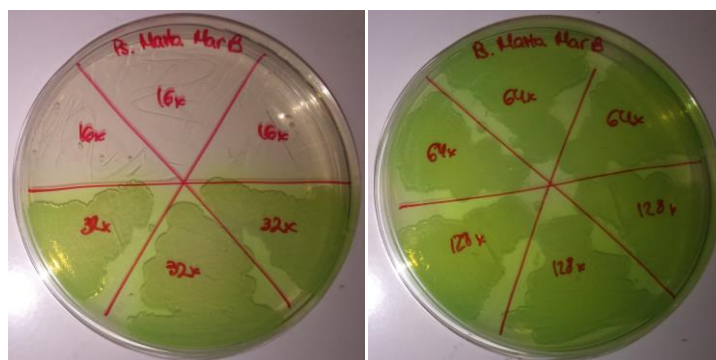


Figura 4.6. Bacterias *P.aeruginosa* obtenidas en las diferentes concentraciones de nanopartículas. A pesar de la inhibición del crecimiento de todas las concentraciones, las bacterias se eliminan completamente con una concentración mayor.

## 4.3 CARACTERIZACIÓN DEL ÁCIDO HIALURÓNICO MODIFICADO

### 4.3.1 Caracterización de los grupos amino

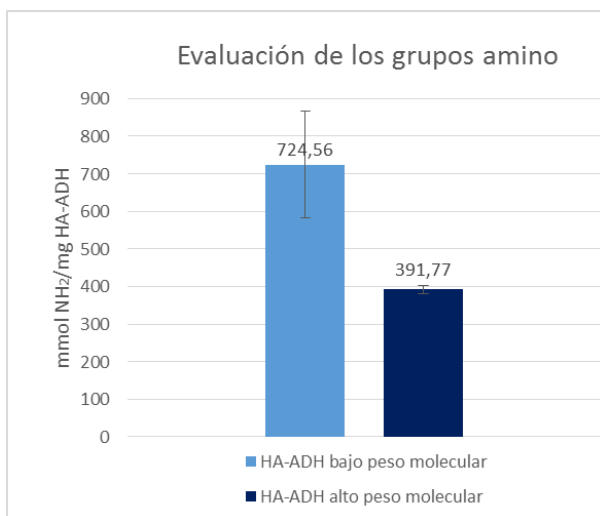


Figura 4.7. Concentración de los grupos amino en el ácido hialurónico obtenidos mediante el análisis con fluorescamina.

Los resultados del análisis de la aminación de los ácidos hialurónicos mediante fluorescamina se muestran en la Figura 4.7, en la que se han representado los milimoles del grupo amino por miligramo de ácido hialurónico en cada uno de ellos.

Los resultados muestran que el ácido hialurónico de bajo peso molecular tiene una concentración mayor de grupos amino que el de alto peso molecular.

En cuanto al análisis de espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier (FTIR), se realizó primero una medida del ácido hialurónico sin modificar para observar su espectro de absorción infrarroja.

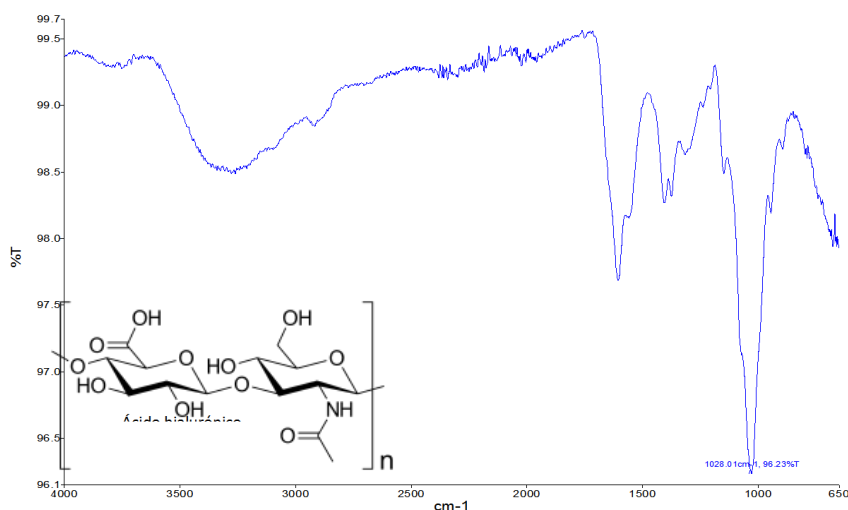


Figura 4.8. Análisis FTIR del ácido hialurónico sin modificar.

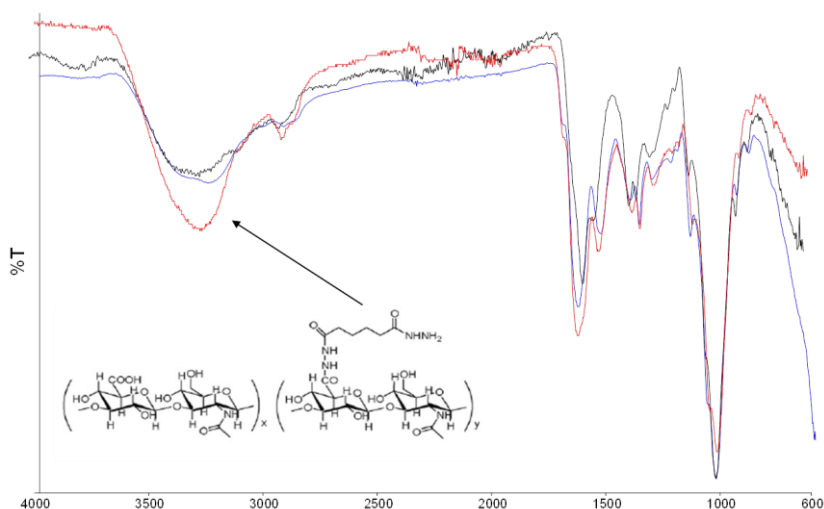


Figura 4.9. Anàlisis FTIR del HA-ADH. La curva roja corresponde al HA-ADH de bajo peso molecular, la azul al de alto peso molecular y la negra al HA sin modificar.

Si se compara la curva de absorbancia de los tres espectros no se ven muchas diferencias, pero se puede observar un ligero aumento en la amplitud en torno a las longitudes de onda de 3200 nm, que se correspondería con la señal de los grupos amino, lo que nos indica por tanto que sí se ha llevado a cabo una aminación de los ácidos hialurónicos. También se ven modificaciones por debajo de 1500 nm, donde se ve que la modificación en los dos ácidos hialurónicos es similar, ya que sus curvas son muy parecidas entre sí.

#### 4.3.2 Caracterización de los grupos tiol

Como se ha explicado en el capítulo anterior, la tiolación del ácido hialurónico se ha evaluado mediante el reactivo Ellman y mediante espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier.

Los resultados relativos al reactivo Ellman se muestran en la Figura 4.10, en la que se han representado los micromoles de grupos tiol que hay por cada miligramo de ácido

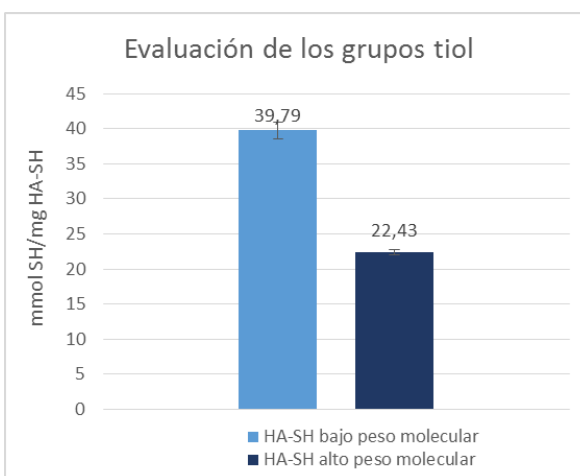


Figura 4.10. Concentración de grupos tiol en el ácido hialurónico, según el análisis con el reactivo Ellman.

hialurónico. Al igual que ocurriría con la aminación, la tiolación es mucho mayor en el ácido hialurónico de bajo peso molecular.

Si comparamos los resultados obtenidos de los análisis de grupos amino y grupos tiol, se puede observar que hay una mayor cantidad de grupos amino. Por lo que podemos deducir que no todos los grupos amino se han modificado a grupos tiol, en ambos ácidos hialurónicos, la proporción de grupos amino que se han conseguido modificar es de alrededor de un 5.5%. Por tanto en el material final encontraremos tanto grupos amino como tioles.

Los resultados obtenidos en el análisis de espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier (FTIR) se muestran en la Figura 4.11. Se puede observar que en este caso aparecen varios picos de absorbancia entre las longitudes de onda de 1000 y 1600 nm que no se encuentran ni en el espectro del ácido hialurónico sin modificar ni en el modificado con grupos amino. Esto significa que sí se ha modificado el material.

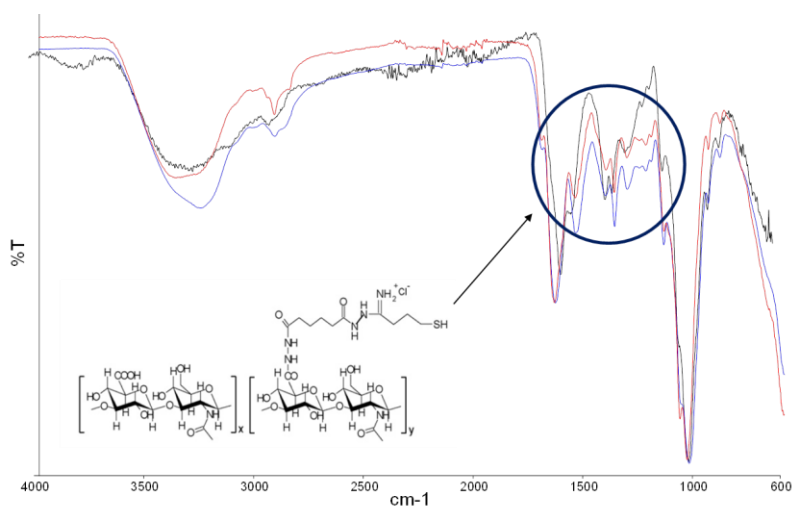


Figura 4.11. Análisis FTIR de los ácidos hialurónicos modificados mediante tiolación

#### 4.4 FORMACIÓN DEL HIDROGEL

Como se ha explicado en el apartado 3.4, para la síntesis de los hidrogeles se realizaron las muestras en distintas concentraciones tanto de ácido hialurónico

como de las Ag-Lig NPs, y se incubaron a 50°C. Durante la incubación se fueron observando las muestras regularmente para poder determinar visualmente el tiempo que tardan en gelificar.

En el caso del ácido hialurónico de bajo peso molecular, las muestras que lo contenían en una concentración final del 0.72% gelifican aproximadamente al cabo de una hora, mientras que las que contenían ácido hialurónico al 0.36% y 0.18% parece que comienzan a gelificar pero que necesitan más tiempo ya que tras dos horas de incubación aún no habían formado completamente un gel. Las muestras con menor concentración de ácido hialurónico no gelificaron.

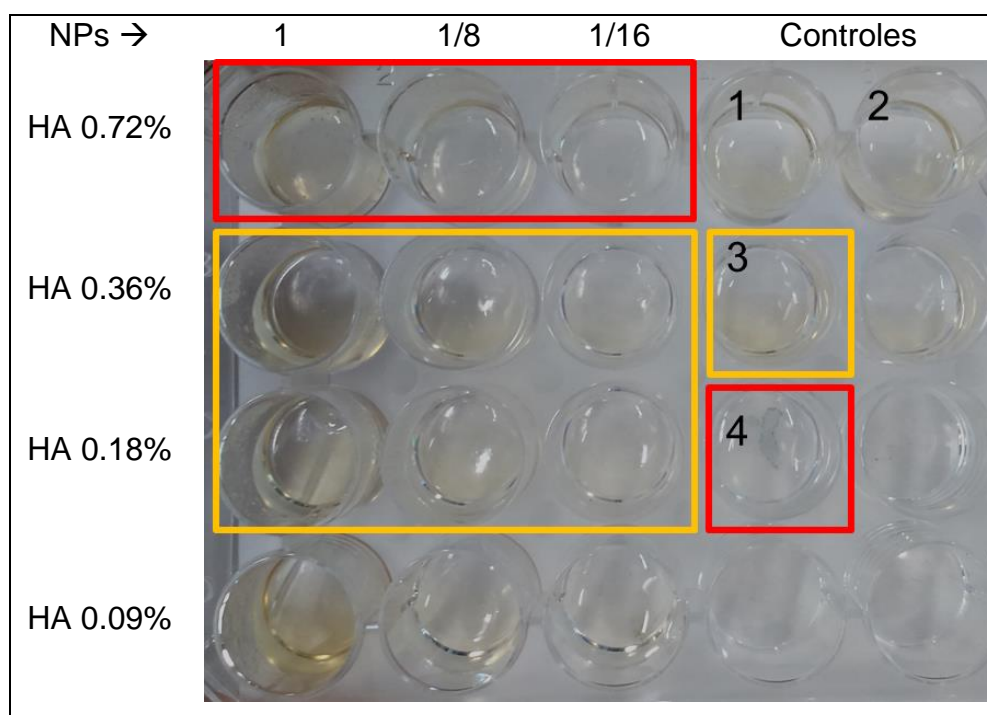


Figura 4.12. Hidrogeles de ácido hialurónico de bajo peso molecular tras dos horas de formación. Los cuadrados rojos indican las muestras que gelificaron en una hora, los amarillos las que estaban parcialmente gelificadas tras dos horas. 1: HA + Ag-Lig NPs 2: HA-SH + Ag-Lig NPs + Lacasa 3: HA + Ag-Lig NPs + Lacasa. 4: HA-SH.

En cuanto a los controles, se observó que el que contenía solamente ácido hialurónico tiolado sí había gelificado tras dos horas. Esto se debe, probablemente, a la formación de enlaces disulfuro entre los tioles del material,



ocasionado por la oxidación de los grupos tiol por el oxígeno atmosférico. Este mismo resultado se encontró en el artículo del mismo grupo de investigación en el que se realiza este trabajo que se ha comentado anteriormente.<sup>38</sup> Los controles que no contenían lacasa no gelificaron, mientras que los que sí la contenían a las dos horas se encontraban parcialmente gelificados, esto ocurre tanto con el ácido hialurónico tiolado como sin tiolar. De esto podemos concluir que la enzima lacasa sí es determinante para la gelificación del ácido hialurónico.

En el caso del hidrogel formado con el ácido hialurónico de alto peso molecular, se encontró que gelifica a partir de una concentración final de HA-SH del 0.045%, como se puede apreciar en la Figura 4.13.

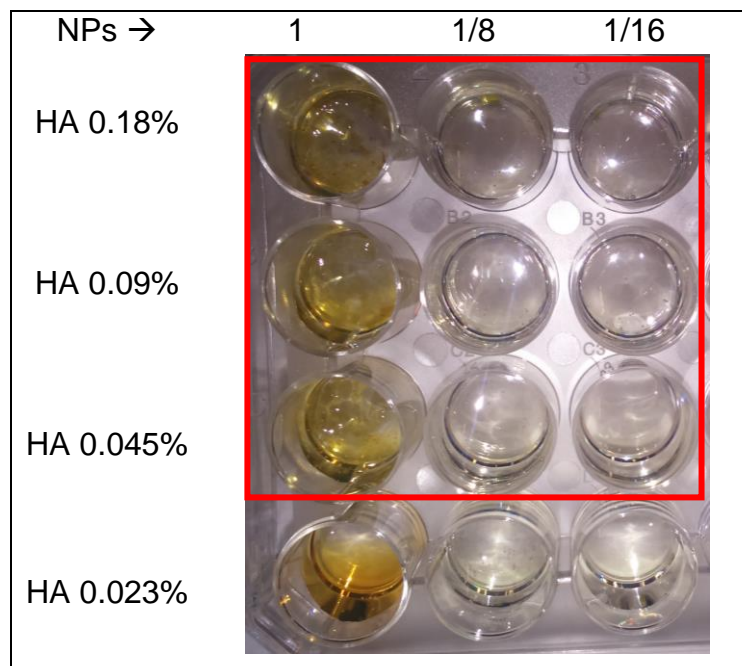


Figura 4.13. Hidrogeles con ácido hialurónico de alto peso molecular tras 2 horas de gelificación. El cuadrado rojo señala las muestras que gelificaron tras dos horas.

En este caso la concentración necesaria para conseguir que gelifique es menor que en el caso anterior debido a que la diferencia de peso molecular hace que los dos materiales presenten inicialmente una viscosidad y una solubilidad diferente. También se observó en este caso que las muestras que contienen las nanopartículas sin diluir formaban agregados en vez de disolverse uniformemente, por lo que esta concentración de nanopartículas es excesiva.

#### 4.5. CARACTERIZACIÓN DEL HIDROGEL

Una vez obtenido el hidrogel se pasó al estudio de su comportamiento reológico, sólo se pudo analizar el hidrogel formado con el ácido hialurónico de bajo peso molecular, con una concentración del 0.72%. No se encontró el punto de gelificación, pero sí se comprobó que la viscosidad del hidrogel aumenta con el paso del tiempo desde el momento en el que comienza la reacción, como se puede observar en la Figura 4.14.

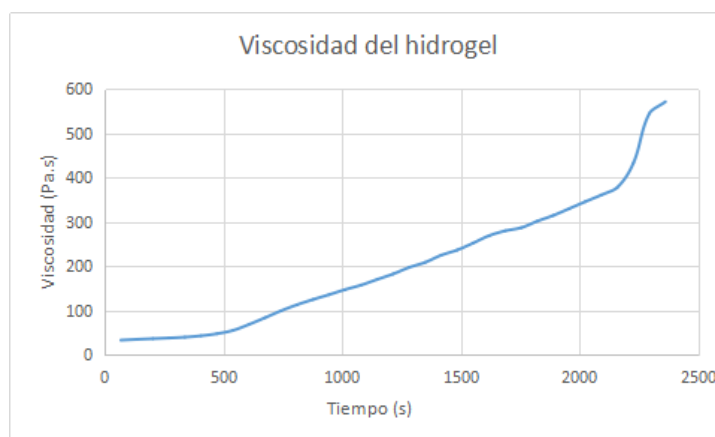


Figura 4.14. Comportamiento reológico del hidrogel.

## 5. CONCLUSIONES

En este proyecto se ha llevado a cabo la formación de dos hidrogeles de ácido hialurónico modificado con nanopartículas de plata y lignina incorporadas. Cada uno de ellos se sintetizó a partir de un ácido hialurónico de diferente peso molecular.

Por un lado, la formación de las nanopartículas de plata y lignina se llevó a cabo con éxito, obteniendo unas nanopartículas estables, cargadas negativamente y relativamente pequeñas y de baja dispersidad de tamaños, lo que aporta, según la literatura, una mejor actividad antimicrobiana. Esta acción bactericida se comprobó frente a las bacterias *S.aureus* y *P.aeruginosa*, responsables de importantes patologías a nivel ocular, concluyendo que las nanopartículas de plata y lignina son, efectivamente, eficaces frente a dichos patógenos. Este hecho es de gran importancia ya que nos permite obtener un material final que será resistente ante agentes bacterianos.

Por otro lado, se han obtenido buenos resultados en lo que se refiere a la modificación del ácido hialurónico. La principal conclusión que se obtiene de estos resultados es que el ácido hialurónico de peso molecular de 200 kDa es más fácil de modificar que el de peso molecular de 1.8 MDa. Esto se aplica tanto para la adición de grupos amino a la estructura molecular del ácido hialurónico, como a la adición de grupos tiol. La elección de uno u otro de los pesos moleculares dependerá de la aplicación final que se le vaya a dar al hidrogel.

Si se compara la cantidad de grupos amino obtenidos frente a la de grupos tiol, se observa que hay más grupos amino que tiol, por lo que se puede concluir que no se consiguen tiolar todos los grupos amino, y que en el material final tendremos tanto grupos amino como grupos tiol.

En cuanto a la formación del hidrogel final, el uso de una muestra control de ácido hialurónico tiolado sin nanopartículas y sin la adición de la enzima lacasa, ha permitido comprobar que el propio ácido hialurónico tiene la capacidad de formar geles a la temperatura de 50°C, posiblemente por la formación de puentes disulfuro entre los grupos tiol conseguidos tras la modificación. Sin embargo, al incorporar las nanopartículas de plata y lignina estos resultados cambian. Las

muestras control formadas por ácido hialurónico, tanto tiolado con sin tiolar, con nanopartículas y sin lacasa, no gelificaron en ningún momento, mientras que las muestras que sí contenían lacasa sí lo hicieron. Por tanto, podemos concluir que el ácido hialurónico tiolado tiene capacidad de formar geles por sí mismo, pero al añadir nanopartículas de plata y lignina requiere la intervención de la enzima para gelificar.

En el estudio del comportamiento reológico del hidrogel final no se pudo encontrar el punto de gelificación, pero sin embargo sí se observó el progresivo aumento de la viscosidad del material desde el primer momento de inicio de la reacción. El aumento de viscosidad nos confirma la capacidad del hidrogel obtenido de crosslinkarse a la temperatura de 50°C y con la intervención de la enzima lacasa. Sin embargo, para obtener más información sobre el comportamiento reológico del hidrogel es necesaria la realización de más experimentos para terminar de optimizar las condiciones óptimas de la formación del hidrogel.

Con este trabajo, queda demostrada la posibilidad de sintetizar un hidrogel a partir de reactivos naturales y con capacidad bactericida, lo que parece indicar que podría ser utilizado como un sistema liberador o portador de fármacos oculares, aunque para ello se requieren aún estudios que confirmen la biocompatibilidad del material, así como otras características como pueden ser la capacidad de absorción de agua o la biodegradabilidad.

Con la realización de este trabajo he aprendido numerosas técnicas de laboratorio, que han aumentado mis competencias en investigación así como mis capacidades de búsqueda de información científica.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

1. Kuno N. y Fujii S. (2011) Recent Advances in Ocular Delivery Systems. *Polymers*, 3, 193-221.
2. Hu X. et al. (2011) Hydrogel contact lenses for extended delivery of ophthalmic drugs. *International Journal of Polymer Science*, 2011.
3. Maulvi F.A., Soni T.G. y Shah D.O. (2016) A review on therapeutic contact lenses for ocular drug delivery. *Drug Delivery*, 1071-7544.
4. Vashist A., Vahists A., Gupta Y.K. y Ahmad S. (2014) Recent advances in hydrogel based drug delivery systems for the human body. *Journal of Materials Chemistry B*, 2, 147-166.
5. Weng Y. et al. (2017) Nanotechnology-based strategies for treatment of ocular disease. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 7(3), 281-291.
6. Misra G.P. et al. (2009) Subconjunctivally implantable hydrogels with degradable and thermoresponsive properties for sustained release of insulin to the retina. *Biomaterials*, 30, 6541-6547.
7. Rathore K.S. et al. (2010) In-situ gelling ophthalmic drug delivery system: an overview. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 2(4), 30-34.
8. Zhang X., Wu D. y Chu C.C. (2004) Synthesis and characterization of partially biodegradable, temperature and pH sensitive Dex-Ma/PNIPAAm hydrogels. *Biomaterials*, 25, 4719-4730.
9. Kamath K.R. y Park K. (1993) Biodegradable hydrogels in drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 11, 59-84.
10. Zhang Z. et al. (2011) Biodegradable thermo- and pH-responsive hydrogel for oral drug delivery. *Journal of Polymer Science, Part A: Polymer Chemistry*, 49, 2941-2951.

11. Hamidi M., Azadu A. y rafiei P. (2008) Hydrogel nanoparticles in drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews* 60, 1638-1649.
12. Alkayyali L.B., Abu-Diak O.A., Andrews G.P. y Jones D.S. (2012) Hydrogels as drug-delivery platforms: physicochemical barriers and solutions. *Therapeutic Delivery*, 3(6), 775-786.
13. Buwalda S.J., Vermonden T. y Hennink W.E. (2017) Hydrogels for therapeutic delivery: Current developments and future directions. *Biomacromolecules*, 18, 316-330.
14. Shulin D. (1998) Recent developments in ophthalmic drug delivery. *Pharmaceutical Science and Technology Today*, 1(8), 328-335.
15. McDermott M.L. y Chandler J.W. (1989) Therapeutic uses of contact lenses. *Survey of Ophthalmology*, 33(5), 381-394.
16. Xinming L. et al. (2008) Polymeric hydrogels for novel contact lens-based ophthalmic drug delivery systems: a review. *Contact Lens and Anterior Eye*, 31(2), 57-64.
17. Hernández P. y Quintero G. (2003) Etiología bacteriana de infecciones oculares externas. *NOVA Publicación científica*, 1(1), 57-64.
18. Hernández-Camarena J.C. et al. (2012) Queratitis infecciosas: tendencias microbiológicas y sensibilidad a antibióticos. Primer reporte anual del Grupo de Estudio de Microbiología Ocular del Instituto de Oftalmología "Conde de Valenciana". *Revista Mexicana de Oftalmología*, 86(4), 213-222.
19. Green M., Apel A. y Stapleton F. (2008) Risk factors and causative organisms in microbial keratitis. *Cornea, the Journal of Cornea and External Disease*, 27(1), 22-27.
20. Robles-Contreras A., Pérez-Cano H.J., Babayan-Sosa A. y Baca-Lozada O. (2013) Bacterial keratitis infection: A battle between virulence factors and the immune response. En: I. Chaudhry (Ed); *Common Eye Infections*; InTech.

21. Morones J.R. et al. (2005) The bactericidal effect of silver nanoparticles. *Nanotechnology*, 16(10), 2346.
22. Widjaja L.K. et al. (2014) Hyaluronic acid-based nanocomposite hydrogels for ocular drug delivery applications. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 2014(102A), 3056-3065.
23. Shu X.Z., Liu Y., Palumbo F. y Prestwich G.D. (2002) Disulfide-crosslinked hyaluronan-gelatin hydrogel films: a covalent mimic of the extracellular matrix for in vitro cell growth. *Biomaterials*, 24, 3825-3834.
24. Collins M.N. (2014) *Hyaluronic acid for biomedical and pharmaceutical applications*. United Kingdom: Smithers Rapra.
25. Jin Y.J., Ubonvan T. y Kim D.D. (2010) Hyaluronic acid in drug delivery systems. *Journal of Pharmaceutical Investigation*, 2010(40), 33-43.
26. Selyanin M.A., Boykov P.Y. y Khabarov V.S. (2015) Seccion 6.3: Hyaluronan in ophthalmology. En: Selyanin M. A., Boykov P.Y. y Khabarov V.S. Hyaluronic acid: preparation, properties, application in biology and medicine (176-176). United Kingdom: Wiley.
27. Santoro C.M., Duchsherer N.L. y Grainger D.W. (2007) Antimicrobial efficacy and ocular cell toxicity from silver nanoparticles. *Nanobiotechnology*, 3(2), 55-65.
28. Rad M.S. et al. (2016) Antibacterial activity of silver nanoparticle-loaded soft contact lens materials: the effect of monomer composition. *Current Eye Research*, 271-3683
29. Bazzaz B.S.F et al. (2014) Preparation, characterization and antimicrobial study of a hidrogel (soft contact lenses) material impregnated with silver nanoparticles. *Contact Lens and Anterior Eye*, 37, 149-152.
30. Amos C.F. y Gerge M.D. (2006) Clinical and laboratory testing of a silver-impregnated lens care. *Contact Lens and Anterior Eye*, 29(5), 247-255.



31. Wilcox M.D., Hume E.B., Vijay A.K. y Petcavich R. (2010) Ability of silver-impregnated contact lenses to control microbial growth and colonisation. *Journal of Optometry*, 3(3), 143-148.
32. Diab R., Khameneh B., Joubert O. y Duval R. (2015) Insights in nanoparticle-bacterium interactions: new frontiers to bypass resistance to antibiotics. *Current Pharmaceutical Design*, 21(28), 4095-4105.
33. Santoro C.M., Duchsherer N.L. y Grainger D.W. (2007) Minimal in vitro antimicrobial efficacy and ocular cell toxicity from silver nanoparticles. *Journal of Nanobiotechnology*, 3(2), 55-65.
34. Pucek R. et al. (2011) The targeted antibacterial and antifungal properties of magnetic nanocomposite of iron oxide and silver nanoparticles. *Biomaterials*, 32(21), 4704-4713.
35. Roizenblatt R. et al. (2006) Nanobiolistic delivery of indicators to the living mouse retina. *Journal of Neuroscience Methods*, 153, 154-161.
36. Chávez-Sifontes M. y Domine M.E. (2013) Lignina, estructura y aplicaciones: métodos de despolimerización para la obtención de derivados aromáticos de interés industrial. *Avances en Ciencias e Ingeniería*, 4(4), 15-46.
37. Erakovic S. Et al. (2014) Novel bioactive antimicrobial lignin containing coatings on titanium obtained by electrophoretic deposition. *International Journal of Molecular Sciences*, 15(7), 12294-12322.
38. Stefanov I., Pérez-Rafael S., Hoyo J., Cailloux J., Santana O.O., Hinojosa-Caballero D. y Tzanov T. (2017) Multifunctional enzymatically generated hydrogels for chronic wound application. *Biomacromolecules*, 18, 1544-1555.
39. Rocasalbas G., Francesko A., Touriño S., Fernández-Francos X., Guebitz G.M. y Tzanov T. (2013) Laccase-assisted formation of bioactive

- chitosan/gelatin hidrogel stabilized with plant polyphenols. *Carbohydrate Polymers*, 92, 989-996.
40. Kant S. y Chander R. (2008) Laccase: enzyme revisited and funtion redefined. *Indian Journal of Microbiology*, 48, 309-316.
  41. Petkova P., Francesko A. y Tzanov T. (2015) Enzyme-assisted formation of hybrid biopolymer hydrogels incorporating active phenolic nanospheres. *Engineering in Life Sciences*, 15, 416-424.
  42. Fernandes M.M., Ivanova K., Hoyo J., Pérez-Rafael S., Francesko A. y Tzanov T. (2017) Nanotransformation of vancomycin overcomes the intrinsic resistance of Gram-Negative bacteria. *ACS Applied Materials and Interfaces*, 9, 15022-15030.
  43. Hahn S.K., Park J.K., Tomimatsu T. y Shimoboji T. (2007) Synthesis and degradation test of hyaluronic acid hydrogels. *International Journal of Biological Macromolecules*, 40, 374-380.
  44. Stocker J.C., Blázquez A., Galaz S. y Juarranz A. (2008) A mechanism for the fluorogenic reaction of amino groups with fluorescamine and MDPF. *Acta histochemica*, 110, 33-340.
  45. Ivanova K., Fernandes M.M., Mendoza E. y Tzanov T. (2015) Enzyme multilayer coatings inhibit *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation on urinary catheters. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99, 4373-7385.
  46. Ellman G.L. (1959) Tissue sulfhydryl groups. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 82(1), 70-77.
  47. Riddles P.W., Blakeley R.L. y Zerner B. (1979) Elman's reagent: 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid)—a re-examination. *Analytical Biochemistry*, 94(1), 75-81.
  48. Dynamic Light Scattering, common terms defined. Malvern Instruments Worlwide, 2011.



49. Shaw R. Dynamic Light Scattering Training. Achieving reliable nano particle sizing. Malvern, ATA Scientific.